

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

CT/DE 00/02757

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 871 918 A (NAPIER MARY E ET AL) ✓ 16. Februar 1999 (1999-02-16) in der Anmeldung erwähnt	1-6
Y	das ganze Dokument	7-14
Y	WO 93 20230 A (ENVIRONMENTAL MED PROD ;HALL GEOFFREY FRANK (GB); HALL JENNIFER MA) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) ✓ das ganze Dokument	1,13,14
Y	WO 98 02399 A (BERTLING WOLF) ✓ 22. Januar 1998 (1998-01-22) das ganze Dokument	1,8-10, 12-14
Y	US 5 567 301 A (STETTER JOSEPH R ET AL) ✓ 22. Oktober 1996 (1996-10-22) das ganze Dokument	1,7,11, 12
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/12/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Knehr, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

T/DE 00/02757

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>US 5 312 527 A (MIKKELSEN SUSAN R ET AL) ✓</p> <p>17. Mai 1994 (1994-05-17)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung und zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PT/DE 00/02757

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5871918	A	16-02-1999	AU 724600 B2 28-09-2000
			AU 6337696 A 30-01-1997
			CA 2225935 A1 16-01-1997
			CN 1192249 A 02-09-1998
			EP 0871773 A2 21-10-1998
			JP 2000501601 T 15-02-2000
			NO 976057 A 24-02-1998
			NZ 311955 A 29-04-1999
			WO 9701646 A2 16-01-1997
			US 6180346 B1 30-01-2001
			US 6127127 A 03-10-2000
			US 5968745 A 19-10-1999
WO 9320230	A	14-10-1993	WO 9320230 A1 14-10-1993
			GB 2280754 A ,B 08-02-1995
WO 9802399	A	22-01-1998	DE 19628171 A1 15-01-1998
			DE 29702254 U1 03-07-1997
			AU 719533 B2 11-05-2000
			AU 3537697 A 09-02-1998
			CA 2260132 A1 22-01-1998
			WO 9802399 A1 22-01-1998
			EP 0912470 A1 06-05-1999
			JP 2000515508 T 21-11-2000
US 5567301	A	22-10-1996	KEINE
US 5312527	A	17-05-1994	KEINE

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 401152GA	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 02757	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 12/08/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 26/08/1999
Anmelder NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT; et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

10/069840
5000

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS


PCT

REC'D 24 JAN 2002

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T9

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 401152GA-we	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02757	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 12/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 26/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT; et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des BerichtsII <input type="checkbox"/> PrioritätIII <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche AnwendbarkeitIV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der ErfindungV <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser FeststellungVI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte UnterlagenVII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen AnmeldungVIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung		
Datum der Einreichung des Antrags 09/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 22.01.2002	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Tel. Nr. +49 89 2399 8434	



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 30 August 2001 (30.08.01)	
International application No. PCT/DE00/02757	Applicant's or agent's file reference 401152GA
International filing date (day/month/year) 12 August 2000 (12.08.00)	Priority date (day/month/year) 26 August 1999 (26.08.99)
Applicant BERTLING, Wolf et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
09 March 2001 (09.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia MULLER Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/DE00/02757

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Susan POTTS BA ACIS

Director to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the German language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/DE00/02757 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: February 7, 2002



Signature of Director :

For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-7 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-14 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1/1, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02757

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Die folgenden, im Internationalen Recherchenbericht angeführten Dokumente, stellen den nächsten Stand der Technik dar:

D1: US-A-5 871 918 (NAPIER MARY E ET AL) 16. Februar 1999 (1999-02-16) in der Anmeldung erwähnt

D2: WO 98 02399 A (BERTLING WOLF) 22. Januar 1998 (1998-01-22)

1. Wie auf Seite 2, erster Absatz der Beschreibung angeführt, sind bekannte voltammetrische Verfahren zum Nachweis von in Lösung befindlichen Biopolymeren aufwendig, da sie entweder den Zusatz besonderer redoxaktiver Moleküle benötigen (wie z.B. in D1 beschrieben, das auf Seite 1 der Beschreibung anerkannt ist), oder auf der Verwendung von aufwendig herzustellenden Chips beruhen.

Eine weitere Möglichkeit wird in D2 (vom Anmelder selbst) beschrieben, das sich auf eine Methode bezieht welche eine beschichtete Elektrode verwendet an die ein Biopolymer mittels Umpolen und Anlegen verschiedener Spannungen, gebunden wird.

2. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem an (mindestens) zwei Elektroden, von denen eine mit einem zweiten Biopolymer beschichtet ist, das eine Affinität zum nachzuweisenden Biopolymer aufweist, eine Spannung und/oder ein Strom angelegt wird, deren (dessen) Änderung durch Anlagerung des zu messenden Biopolymers gemessen wird, wird in den bekannten Dokumenten weder offenbart, noch kann es daraus in naheliegender Weise abgeleitet werden.
3. Der Gegenstand von Anspruch 1 ist somit neu und erfinderisch im Sinne von Artikel 33(2) und 33(3) PCT. Dasselbe trifft auf die abhängigen Ansprüche 2-14 zu.

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

8 March 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) International publication number

WO 01/16361 A2

(51) International patent classification⁷: C12Q 1/68

(21) International application number: PCT/DE00/02757

(22) International filing date: 12 August 2000 (12.08.2000)

(25) Language of filing: German

(26) Language of publication: German

(30) Data relating to the priority:
199 40 647.2 26 August 1999 (26.08.1999) DE

(71) Applicant (for all designated States except US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, D-91056 Erlangen (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). SCHÜLEIN, Jürgen [DE/DE]; Neue Strasse 26, D-91054 Erlangen (DE). HASSMANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118 a, D-91052 Erlangen (DE).

(74) Attorney: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A, D-91052 Erlangen (DE).

(81) Designated states (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated states (regional): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW). Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- Without the International Search Report and to be republished once the report has been received.

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

As printed

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AND QUANTIFYING FIRST BIOPOLYMERS THAT ARE LOCATED IN A LIQUID

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS UND ZUR QUANTIFIZIERUNG VON IN EINER FLÜSSIGKEIT BEFINDLICHEN ERSTEN BIOPOLYMEREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and quantifying first biopolymers (1) that are located in a liquid. Second biopolymers (2) having a specific affinity towards the first biopolymers (1) to be detected are bound to the surface of a first electrode (E1). The first and at least one second electrode are dipped into the liquid. The inventive method comprises the following steps: a) applying a changeable voltage and/or a changeable current over the first (E1) and second electrode (E2) and b) measuring the direct change of voltage and/or current, whereby said change is the result of the accumulation of the first biomolecules (1) to the second biomolecules (2).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren (1), wobei zweite zu den nachzuweisenden ersten Biopolymeren (1) eine spezifische Affinität besitzende Biopolymere (2) an die Oberfläche einer ersten Elektrode (E1) gebunden sind und wobei die erste und mindestens eine zweite Elektrode in die Flüssigkeit eingetaucht sind, mit folgenden Schritten: a) Anlegen einer veränderlichen Spannung und/oder eines veränderlichen Stroms über der ersten (E1) und der zweiten Elektrode (E2) und b) Messung einer durch die Anlagerung der ersten Biomoleküle (1) an die zweiten Biomoleküle (2) bedingten unmittelbaren Änderung der Spannung und/oder des Stroms.

WO 01/16361 A2

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. März 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/16361 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A, D-91052 Erlangen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02757
- (22) Internationales Anmeldedatum:
12. August 2000 (12.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 40 647.2 26. August 1999 (26.08.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, D-91056 Erlangen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). SCHÜLEIN, Jürgen [DE/DE]; Neue Strasse 26, D-91054 Erlangen (DE). HASSMANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118 a, D-91052 Erlangen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
- Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AND QUANTIFYING FIRST BIOPOLYMERS THAT ARE LOCATED IN A LIQUID

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS UND ZUR QUANTIFIZIERUNG VON IN EINER FLÜSSIGKEIT BEFINDLICHEN ERSTEN BIOPOLYMEREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and quantifying first biopolymers (1) that are located in a liquid. Second biopolymers (2) having a specific affinity towards the first biopolymers (1) to be detected are bound to the surface of a first electrode (E1). The first and at least one second electrode are dipped into the liquid. The inventive method comprises the following steps: a) applying a changeable voltage and/or a changeable current over the first (E1) and second electrode (E2) and b) measuring the direct change of voltage and/or current, whereby said change is the result of the accumulation of the first biomolecules (1) to the second biomolecules (2).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren (1), wobei zweite zu den nachzuweisenden ersten Biopolymeren (1) eine spezifische Affinität besitzende Biopolymere (2) an die Oberfläche einer ersten Elektrode (E1) gebunden sind und wobei die erste und mindestens eine zweite Elektrode in die Flüssigkeit eingetaucht sind, mit folgenden Schritten: a) Anlegen einer veränderlichen Spannung und/oder eines veränderlichen Stroms über der ersten (E1) und der zweiten Elektrode (E2) und b) Messung einer durch die Anlagerung der ersten Biomoleküle (1) an die zweiten Biomoleküle (2) bedingten unmittelbaren Änderung der Spannung und/oder des Stroms.

WO 01/16361 A2

Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur
5 Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren.

Nach dem Stand der Technik ist es bekannt, Polynukleotidsequenzen, wie DNA, durch voltammetrische Verfahren nachzuweisen.
10 Dazu wird in der US 5,312,572 vorgeschlagen, redoxaktive Moleküle der Lösung zuzusetzen. Diese Moleküle binden im Falle der Hybridisierung an das aus den Polynukleotidsequenzen gebildete doppelsträngige Molekül. Das redoxaktive Molekül bewirkt ein meßbares Redoxsignal. Ein ähnliches Verfahren ist
15 auch aus der US 5,871,918 bekannt.

Aus der WO 96/01836 ist ein sogenannter Chip zum Nachweis von Polynukleotidsequenzen bekannt. Auf dem Chip sind eine Vielzahl miniaturisierter Reaktionskavitäten vorgesehen. In jeder
20 der Reaktionskavitäten ist eine besondere Polynukleotidsequenz gebunden. Beim Eintauchen des Chips in eine die nachzuweisende Polynukleotidsequenz enthaltende Lösung kommt es zur Hybridisierung mit einer der besonderen Polynukleotidsequenzen. Die Hybridisierung wird mittels Fluoreszenz nachgewiesen.
25 sen.

Auch die WO 95/12808 betrifft ein Nachweisverfahren mittels Chip. Dabei wird über den Chip nach Art einer Elektrode eine Spannung angelegt. Geladene in der Lösung befindliche Polynukleotidsequenzen können damit an der Oberfläche des Chips
30 bzw. an den dort vorgesehenen miniaturisierten Reaktionsgefäßen angereichert werden.

Die Verfahren nach dem Stand der Technik sind aufwendig. Sie erfordern den Zusatz besonderer redoxaktiver Moleküle oder das Vorsehen aufwendig herzustellender Chips. Eine exakte Quantifizierung der nachzuweisenden Biopolymere ist mit den bekannten Verfahren nicht möglich. Es ist meist eine optische Detektion erforderlich. Das erhöht den apparativen Aufwand.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst einfach und kostengünstig durchführbares Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen Biopolymeren angegeben werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 14.

Nach Maßgabe der Erfindung wird zum Nachweis und zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren ein Verfahren vorgeschlagen, wobei zweite zu den nachzuweisenden ersten Biopolymeren eine spezifische Affinität besitzende Biopolymere an die Oberfläche einer ersten Elektrode gebunden sind und wobei die erste und mindestens eine zweite Elektrode mit der Flüssigkeit in Kontakt sind, mit folgenden Schritten:

- a) Anlegen einer Spannung und/oder eines Stroms über der ersten und der zweiten Elektrode und
- b) Messung einer durch die Anlagerung der ersten Biomoleküle an die zweiten Biomoleküle bedingten unmittelbaren Änderung der Spannung und/oder des Stroms.

3

Das vorgeschlagene Verfahren ist einfach und schnell durchführbar. Die Änderung der Spannung und/oder des Stroms wird unmittelbar gemessen, d.h. das Vorsehen besonderer redoxaktiver Moleküle entfällt. Es ist insbesondere auch eine Quantifizierung der in der Flüssigkeit enthaltenden nachzuweisenden ersten Biopolymere auf einfache Weise möglich.

Die angelegte Spannung bzw. der Strom können veränderlich sein, z.B. kann es sich dabei um Wechselstrom handeln. Beim Schritt lit. b kann ein Gleichspannungssignal gemessen werden, wobei die Messung vorteilhafterweise als zykovoltammetrische Messung geführt wird. In diesem Fall werden die Redoxprozesse der an den zweiten Biopolymeren angelagerten ersten Biopolymere und der Faradayische Elektronentransfer durch die Oberfläche der ersten Elektrode bei einer vorgegebenen Spannung oder in einem vorgegebenen Spannungsbereich genutzt.

Zum Nachweis und zur Quantifizierung des ersten Biopolymers wird vorteilhafterweise der gemessene Strom bzw. die gemessene Spannung über der Zeit aufgetragen und mindestens über einem Peak integriert. Die Integration erfolgt zweckmäßigerweise unter Abzug des Untergrunds. Aus dem sich bei der Integration ergebenden Wert kann die durch die Anlagerung der ersten Biopolymere übertragene Ladungsmenge ermittelt werden. Daraus läßt sich auf die Zahl der angelagerten ersten Biopolymere schließen. Es ist eine Eichung möglich. Die Konzentration der nachzuweisenden ersten Biopolymere in der Flüssigkeit kann bestimmt werden. Das vorgeschlagene Verfahren ist besonders einfach, weil hier - wie bei der herkömmlichen zyklischen Voltammetrie - nur zwischen der ersten Elektrode und einer Referenzelektrode zyklisch eine lineare Spannungsrampe durchgeführt wird. Es ist nicht notwendig redoxaktive Moleküle zum Ladungstransport einzusetzen.

4

Der Stromfluß kann über eine dritte Elektrode bzw. eine Gegenelektrode gemessen werden. Beim Auftragen des gemessenen Stroms bzw. der gemessenen Spannung über der Zeit sind charakteristische Peaks beobachtbar, die der Anlagerung bzw. Adsorption sowie einer Desorption der ersten Biopolymere zugeordnet werden können.

Eine weitere Ausgestaltung besteht darin, phasensensitiv ein Wechselstromsignal zu messen. Die Anlagerung der ersten Biopolymere an die an der ersten Elektrode endständig gebundenen zweiten Biopolymere verursacht eine Änderung der durch die Anlagerung und Abstoßung der geladenen Biopolymere bedingten Doppellagenkapazität. Die vorgeschlagene phasensensitive Messung ermöglicht die Ermittlung des kapazitiven Anteils des Wechselstromsignals. Die Kenntnis des kapazitiven Anteils läßt auf die Konzentration des nachzuweisenden ersten Biopolymers in der Flüssigkeit schließen.

Es ist in diesem Zusammenhang möglich, das Wechselstromsignal einem zyklischen Gleichstromsignal aufzuprägen. Nach einer weiteren Ausgestaltung des Verfahrens wird die Impedanz gemessen, indem die voltammetrischen Signale bei variierender Frequenz gemessen werden. Das ermöglicht eine unmittelbare Quantifizierung des Bedeckungsgrades mit nachzuweisenden ersten Biopolymeren auf der Oberfläche der ersten Elektrode.

Vorteilhaft ist es, vor dem Schritt lit. a die ersten Biopolymere durch Anlegen einer Spannung und/oder eines Stroms an der Oberfläche der ersten Elektrode anzureichern. Besonders wirkungsvoll ist die Anreicherung, wenn dabei zyklisch umgepolt wird. Dadurch werden nicht zu den zweiten Biopolymeren komplementäre Moleküle von der Oberfläche abgestoßen.

5

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist vorgesehen, daß die erste Elektrode mit dem daran angereicherten ersten Biomolekülen aus der Flüssigkeit entfernt und, ggf. nach Ausführen eines Waschschriffs, zur Messung mit einer definierten Meßlösung in Kontakt gebracht. Dadurch können störende Einflüsse durch in der Flüssigkeit eventuell befindliche weitere elektrochemisch wirksame Spezies weitgehend unterdrückt werden. Es findet gewissermaßen eine der Messung vorgeschaltete Aufreinigung statt.

10

Das zweite Biopolymer ist zweckmäßigerweise mit einem Ende kovalent oder über einen Linker an die Oberfläche der ersten Elektrode gebunden. Selbstverständlich können zur Bindung auch Spacermoleküle zwischengeschaltet sein. Die erste Elektrode ist zweckmäßigerweise aus einem der folgenden Materialien hergestellt: Kunststoff, Keramik, Glas oder Metall. Insbesondere Polycarbonate und Gold haben sich als Elektrodenmaterialien als besonders vorteilhaft erwiesen.

20 Unter den ersten und den zweiten Biopolymeren werden hier insbesondere Proteine, Peptide, DNA, RNA und dgl. verstanden. Das erste Biopolymer kann insbesondere eine zum zweiten Biopolymer komplementäre einzelsträngige DNA oder RNA sein. Beim Schritt lit. b wird also vorzugsweise die durch die Hybridisierung der vorgenannten Biopolymere bedingte Änderung der Spannung und/oder des Stroms gemessen.

30

Das Verfahren wird anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Dazu zeigen die

Fig. 1 ein zyklisches Voltammogramm und

Fig. 2 die Änderung des Wechselstroms aufgetragen über der Frequenz und

Fig. 3 eine schematische Ansicht eines Messaufbaus.

Beispiel 1: Gleichspannung-Voltammetrische Messung

- 5 Ein Teil einer für das human growth hormone kodierenden DNA-Sequenz (HGH1) ist mit seinem 5'-Ende an eine aus Polycarbonat/Kohlefaser hergestellte erste Elektrode E1 bzw. Arbeitselektrode gebunden. Die erste Elektrode E1 taucht in eine Lösung ein, die 5fM/ μ l einer komplementären DNA-Sequenz (HGH1 comp.), 80mM TBE Puffer und 100mM NaCl Leitsalz enthält.

- Eine Spannung wird linear mit einer Änderungsrate von 10mV/s von 0 auf 1.3V erhöht, dann zurück bis -1.3V und schließlich wieder bis auf 0V gefahren. Das dabei gemessene zyklische Voltammogramm ist in Fig. 1 gezeigt. Es sind zwei Peaks zu erkennen. Beim anodischen Potentialdurchlauf tritt ein erster Peak P1 bei $-U=749.5$ mV gegen Ag/AgCl auf, beim kathodischen Potentialdurchlauf ergibt sich ein zweiter Peak P2 bei $U=-864.3$ mV gegen Ag/AgCl. Diese Peaks treten nur auf, wenn sich zu den auf der Oberfläche der Elektrode fixierten ersten Biopolymeren komplementäre zweite Biopolymere in der Lösung befinden. Die Peaks P1, P2 sind ausschließlich auf Redoxprozesse zurückzuführen, die im vorliegenden Beispiel durch Hybridisation von HGH1 mit HGH1 comp. bedingt sind. Der im anodischen Bereich befindliche erste Peak P1 ist die Folge eines Redoxprozesses, der durch die Adsorption bzw. Anlagerung von HGH1 an HGH1 comp. bedingt ist. Der im kathodischen Bereich beobachtbare zweite Peak P2 kann mit der einer Desorption der hybridisierten Nukleinsäuren in Verbindung gebracht werden.
- 30 Die zeitliche Integration des ersten Peaks P1 entspricht der durch die Elektrodenoberfläche transportierten Ladungsmenge. Daraus kann auf das Maß der Hybridisation auf der Oberfläche der ersten Elektrode geschlossen werden.

Beispiel 2: Wechselstrom-Voltammetrische Messung

Es wird dieselbe Elektrode und Lösung wie im Beispiel 1 verwendet.

5

Ein Gleichspannungsscan von 0V bis 1V gegen Ag/AgCl wird angelegt und dieser Gleichspannung wird eine Wechselspannung von 250Hz überlagert. Der Wechselstrom wird in einer Phasenverschiebung von 90° zur Wechselspannung gemessen. Ist die
10 erste Elektrode mit zu den in der Lösung befindlichen nachzuweisenden ersten Biopolymeren komplementären zweiten Biopolymeren belegt, so ergibt sich der in Fig. 2 gezeigte Peak bei 250mV. Dieser Peak ist durch eine Kapazitätsänderung bedingt, die durch den Transport negativer Ladungen an die Oberfläche
15 der ersten Elektrode bei der Hybridisation hervorgerufen wird. Die Änderung in der Doppellagenkapazität resultiert in einem kapazitiven Stromfluß, der durch phasensensitive Messung des Wechselstromanteils detektiert werden kann. Die obere Kurve zeigt das Wechselstromsignal bei unbelegter erster
20 Elektrode. Ein Peak ist hier nicht beobachtbar.

In Fig. 3 ist schematisch der Meßaufbau gezeigt. In eine Flüssigkeit tauchen eine erste Elektrode E1, eine zweite Elektrode E2 und eine dritte Elektrode E3 ein. Die erste
25 Elektrode E1 ist die Arbeitselektrode. Daran sind zweite Biopolymere, z.B. DNA, mittels eines Linkers kovalent gebunden. In der Flüssigkeit befinden sich erste Biopolymere (1), die komplementär zu den zweiten Biopolymeren (2) sind. Die zweite Elektrode (E2) dient als Gegenelektrode, die dritte Elektrode
30 (E3) als Referenzelektrode.

Das folgende Sequenzprotokoll gibt die Sequenzen von HGH1 und HGH1 comp. wieder.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren (1), wobei
5 zweite zu den nachzuweisenden ersten Biopolymeren (1) eine spezifische Affinität besitzende Biopolymere (2) an die Oberfläche einer ersten Elektrode (E1) gebunden sind und wobei die erste und mindestens eine zweite Elektrode (E2) mit der Flüssigkeit im Kontakt sind, mit folgenden Schritten:
10
 - a) Anlegen einer Spannung und/oder eines Stroms über der ersten (E1) und der zweiten Elektrode (E2) und
 - b) Messung einer durch die Anlagerung der ersten Biopolyme-
15 re (1) an die zweiten Biopolymere (2) bedingten unmittelbaren Änderung der Spannung und/oder des Stroms.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei beim Schritt lit. b ein
20 Gleichspannungssignal gemessen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Messung als zyko-
voltammetrische Messung geführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei zum Nachweis und
25 zur Quantifizierung des ersten Biopolymers (1) der gemessene Strom oder die gemessene Spannung über der Zeit aufgetragen und über mindestens einem Peak integriert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein Wechselstromsignal
30 phasensensitiv gemessen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Wechselstromsignal einem zyklischen Gleichstromsignal aufgeprägt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Impedanz gemessen wird, indem die voltammetrischen Signale bei variierender Frequenz gemessen werden.
- 5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei vor dem Schritt lit. a die ersten Biopolymere (1) durch Anlegen einer Spannung und/oder eines Stroms an der Oberfläche der ersten Elektrode (E1) angereichert werden.
- 10 9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei zyklisch umgepolt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei die erste Elektrode (E1) mit den daran angereicherten ersten Biomolekülen (1) aus der Flüssigkeit entfernt und zur Messung mit einer
15 definierten Meßlösung in Kontakt gebracht wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zweite Biopolymer (2) mit einem Ende kovalent oder über einen Linker an die Oberfläche der ersten Elektrode (E1) ge-
20 bunden ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die erste Elektrode (E1) aus einem der folgenden Materialien hergestellt ist: Kunststoff, Keramik, Glas, Metall.
25
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das erste Biopolymer (1) eine zum zweiten Biopolymer (2) komplementäre einzelsträngige DNA oder RNA ist.
- 30 14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei beim Schritt lit. b die durch die Hybridisierung der Biopolymere (1, 2) bedingte Änderung der Spannung und/oder des Stroms gemessen wird.

1/3

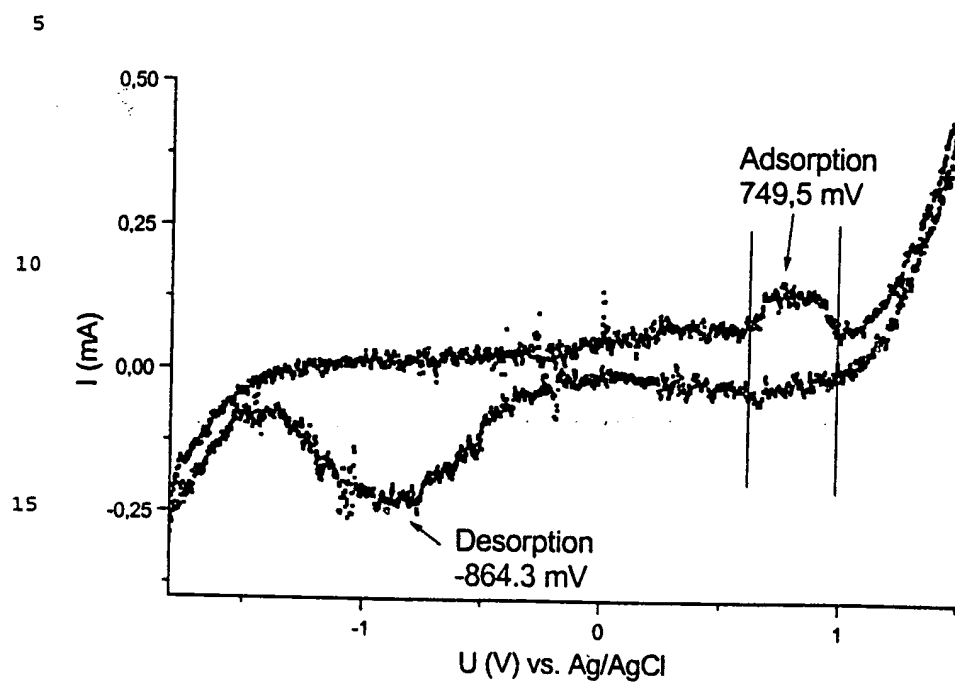


Fig. 1

2/3

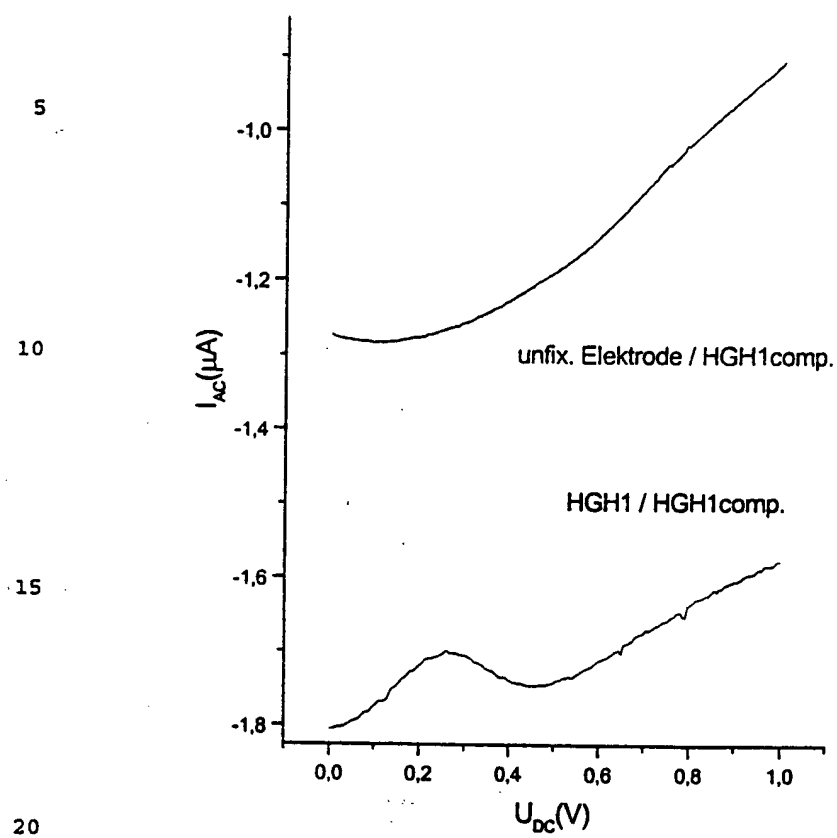


Fig. 2

3/3

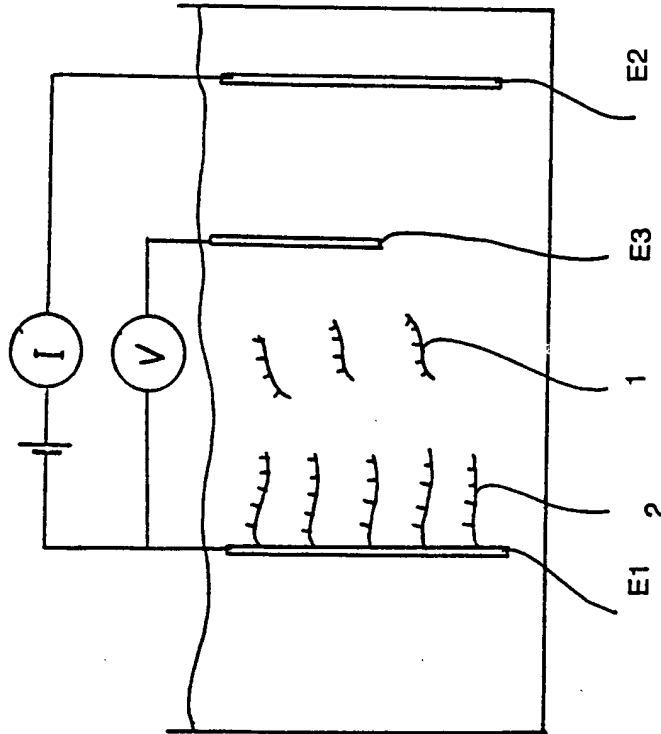


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

- 5 <110> november Aktiengesellschaft
Gesellschaft für Molekulare Medizin
- <120> Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von
in einer Flüssigkeit befindlichen Biopolymeren
- 10 <130> 401152GA
- <140>
<141>
- 15 <160> 2
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 20 <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 25 <400> 1
gccttcctaa ccattccctt a 21
- 30 <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 35 <400> 2
taaggggaatg gttaggaagg c 21